

(総合研究報告書)

## 21 分指-3-① がんの生物学的特性に着目した治療法および診断法の評価系の確立に関わる研究

富田 章弘 公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部

### 研究の分類・属性

基礎系

### 研究の概要

本研究は、がん組織の微小環境の生物学に立脚した薬剤開発、診断法開発のための評価法の確立を目指すものである。特に、グルコース欠乏などの栄養飢餓状態に伴う、がん細胞のエネルギー代謝の変化やストレス応答を標的とする創薬研究の推進のための評価基盤を築くことを目的とする。本目的達成のため、1. がんの代謝特性に基づく薬剤の探索・作用機序解析、2. がんの生物学的特性の検出法、3. 作用コンセプトに基づく動物実験モデル構築と検証 の観点から、これまでに整えた共同研究体制を活用し研究に取り組む。

伝統薬物などから栄養飢餓条件下で選択的に細胞毒性を發揮する薬剤を探索する。また、これまでに見出してきた化合物を含め、作用機序解析を進める。そして、班員がおのおの見出した薬剤について、作用機序などの基盤情報の共有を加速させ、その情報を活用した化合物探索とその活性評価研究を行うことにより、共有基盤情報をさらに強化する。また、有用性の明らかになったメタボローム解析を一層活用し、栄養飢餓条件下で作用する薬剤の細胞毒性をエネルギー代謝の観点から評価し、薬剤の標的や作用機序の解明に役立てる。加えて、がんの増殖に関わることが明らかになってきた脂質代謝酵素について、治療標的としての可能性を追求するとともに、微小環境との関連を研究する。がんの生物学的特性の検出法としては、低酸素細胞集積性プローブを用いた臨床への展開研究、がん細胞の特徴をモニターする RI プローブや蛍光プローブの開発研究、腫瘍モデルでのメタボローム解析研究を続行する。これらの研究により得られる情報やツールを有効に活用し、上記の薬物が *in vivo* でも想定している環境や機序で作用し得るかを検証する研究を班内の共同作業を通じて推進し、微小環境から見た適切な動物実験モデルによる評価系の構築を目指す。

これらの研究を、班研究として効果的に融合し行うことによって、評価系構築のための基盤が確実に築かれることが期待される。なお本研究は、主に動物や培養細胞を用いた研究であるが、臨床材料を用いる研究も含まれており、各種倫理指針等を遵守し、各施設で倫理審査を受け、適切な措置を講じ研究を行う。

### 研究経費

年度	
平成21年度	13,400 千円
平成22年度	11,660 千円
平成23年度	9,328 千円

### 研究班の組織

富田 章弘 (H21-23年度)	公益財団法人がん 研究会・がん化学 療法センター部長	固形がん内部環境に対する 細胞応答を標的とした治療 法の研究
土原 一哉 (H23年度)	国立がん研究セン ター・東病院臨床 開発センター が ん治療開発部 室長	栄養飢餓耐性分子機構の解 析

門田 重利 (H21-23年度)	富山大学・和漢医 薬学総合研究所 教授	栄養飢餓条件下で作用する 薬剤の探索
曾我 朋義 (H21-23年度)	慶應義塾大学・環 境情報学部 先端 生命科学研究所 教授	メタボローム解析
清野 泰 (H22-23年度)	福井大学・高エネ ルギー医学研究セ ンター 准教授	サイクロトロンを利用した がんの核医学診断・治療用 プローブの開発
浦野 泰照 (H21-23年度)	東京大学・大学院 医学系研究科教授	がんの生物学的特性に基づ く蛍光プローブの創製
清宮 啓之 (H21-23年度)	公益財団法人がん 研究会・がん化学 療法センター部長	脂質代謝を標的とする治療 法の分子基盤・モデル系作 りと検証
藤林 康久 (H21年度)	福井大学・高エネ ルギー医学研究セ ンター 教授	PETを用いる低酸素細胞イ メージングならび治療
中川 雅夫 (班友) (H21年度)	愛知県がんセンター 研究所、分子生物学 および血液内科遺伝子 医療研究部 主任研究員	発現解析を用いた成人T細 胞性白血病リンパ腫の臨床 病型診断の検討
塩崎 一弘 (班友) (H21年度)	宮城県立がんセン ター研究所、糖鎖 生物学生化学部 博士研究員	シアリダーゼ制御による新 規がん治療法・診断法の開 発
光永 修一 (班友) (H21年度)	国立がんセンター東病院、 肝胆膵内科臨床開発 センター 臨床腫瘍病理 部医師、研究員	膵がん抗悪液質療法に適し た患者集団の選定、および 投与により改善が期待でき る病状の同定

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標)

がん細胞特異的な分子変化を標的にする治療法開発が精力的に試みられている。しかし、その特異性、および両性細胞の出現など解決すべき点も多い。本研究では、がん組織に見られる特殊な微小環境に着目し、その生物学的特性

に立脚した治療法および診断法開発に有用な評価系の確立を目指す。具体的には、1. がんの代謝特性に基づく薬剤の探索・作用機序解析、2. がんの生物学的特性の検出法、3. 作用コンセプトに基づく動物実験モデル構築と検証を中心に研究展開し、評価系の確立に結びつけることを目的とする。

低酸素状態や栄養飢餓状態を特徴とするがん微小環境では、がん細胞は代謝変化やストレス応答により生存すると考えられている。申請者らはこれまでに、がん細胞の栄養飢餓耐性反応を見出し、これを解除するキガマイシンやアルクチゲニン等の化合物が抗腫瘍効果を示すことを明らかにしてきた(門田、土原)。また同様に栄養飢餓状態で細胞毒性を示し抗腫瘍効果を有する VST 等の化合物が、がん細胞の小胞体ストレス応答を抑制することを明らかにしてきた(富田)。加えて最近では、がんにおける脂質代謝の重要性も明らかになってきた(清宮)。これらの事実は、微小環境におけるがん細胞のエネルギー代謝の変化やそれに伴う細胞応答が治療標的となることを示している。しかし、アルクチゲニンや VST 等の化合物は培養細胞系では類似した作用を示すものの、その作用機序や生体内での作用様式については不明な点が多く、臨床開発への展開は容易ではない。

こうした新たなタイプの薬剤の開発支援のためには、微小環境におけるがん細胞の特徴を診断し治療に結びつけるための評価系の構築が必須である。この必要性に対応するべく、本研究では、より有効な薬剤候補の探索を続行し作用機序解析を進めるとともに、ヒトがんの微小環境からみた適切なモデル系の構築に取り組む。その際に、これまでの研究から有用性が明らかになってきた、キャピラリー電気泳動-質量分析装置によるメタボローム解析の手法(曾我)を活用し、エネルギー代謝物質の解析を効率的に行う。また同時に、低酸素状態やがん細胞の生物活性を検出できる独自技術(清野、浦野)を基盤に、微小環境の評価に有用なプローブの創製研究を進める。これらを班研究として効果的に融合し、評価系構築のための基盤を迅速に築くことを目指す。

#### (研究終了時点の実績要点)

- ・ 遺伝子発現データや細胞毒性パターンを活用することによって、栄養飢餓環境下で作用する栄養飢餓耐性解除薬や UPR 抑制化合物を評価し探索することが可能であることを明らかにした。
- ・ 薬用植物等から栄養飢餓環境下で選択的にがん細胞を死滅させる新たな化合物の探索研究を進め、Kayeassamins (A, B, D, E, G)、chrysoplenetin、chrysosplenol D、Ostruthin、Bornyl ferulate、Damnacanthal、キサントン類縁化合物を単離・同定した。
- ・ 臨床開発ステージにある栄養飢餓耐性解除薬アルクチゲニンについて、構造活性相関を明らかにするとともに、UPR 抑制活性を有することを明らかにした。
- ・ 栄養飢餓耐性解除薬(アルクチゲニン、キガマイシン、パモ酸ピルビニウム)がグルコース欠乏環境特異的に殺細胞効果を発揮する際に細胞内活性酸素(ROS)が重要な働きを担うことを明らかにした。また、メタボローム解析により、アルクチゲニンによって酸化リン酸化の阻害が示唆される結果を得た。
- ・ 7 種のがん細胞株および 4 種の正常細胞をグルコース欠乏かつ低酸素条件において培養し、メタボローム解析を行い、ほぼ全てのがん細胞株においてフマル酸の減少およびコハク酸の蓄積が確認され、がん細胞がフマル酸呼吸により ATP 生成を行っている可能性を示唆する結果を得るとともに、これらの変化が、栄養飢餓耐性解除薬として見出された、フマル酸呼吸の阻害作用を持つピルビニウムパモエートにより阻害されることを明らかにした。
- ・ 脂質代謝酵素である ATP-クエン酸リアーゼ (ACLY)、アセチル Co-A カルボキシラーゼ (ACAC)、脂肪酸合成酵素 (FASN) のノックダウンにより、これら酵素の枯渇が様々ながん細胞の増殖抑制を導くこと、特に効果の強かった ACLY の枯渇による細胞増殖抑制は ROS および AMPK のリン酸化のレベルが低い細胞で顕著であることが明らかになった。
- ・ 低酸素部位集積性の  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM は、低酸素領域やミトコンドリア機能不全領域に集積すること、担がんマウスにおいて治療効果を有すること、また、 $^{62}\text{Cu}$ -ATSM を用いた臨床 PET イメージング研究において、 $^{18}\text{F}$ -FDG の集積パターンと異なることを見出した。一方で、新しい放射性プローブの Br-BTdu の研究を進め、増殖能の高いがん細胞に集積し、その細胞内での集積部位が DNA 画分であることを明らかにした。
- ・ 加水分解酵素活性を検出可能な蛍光プローブの設計法を確立し、種々のアミノペプチダーゼ活性を鋭敏に検出する蛍光プローブ群の開発に成功した。そして、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) に対する蛍光プローブによって、がん部位と正常部位の境界を可視化できることが明らかとなった。
- ・ UPR 阻害化合物のなかで水溶性ビッグアナイドのブホルミンを用い、翻訳開始抑制因子 4E-BP1 の脱リン酸化が栄養飢餓選択的に作用する薬剤のバイオマーカーとして利用可能なことが明らかになった。
- ・ アルクチゲニンの治療効果の検証実験を進め、ヒト臓器がんゼノグラフトモデルにおいて、ゲムシタビンの併用によってそれぞれ単独よりも有効性が高まることを見出した。
- ・ 栄養飢餓選択的薬剤を用いた研究から、これらの薬剤の中にはミトコンドリア機能を抑制するものが多く含まれることが明らかになってきたが、こうした薬剤の抗腫瘍効果と合致して、ミトコンドリア DNA を欠損した  $\rho 0$  細胞株は造腫瘍性が非常に低いことを見出した。

- ・ 新しい放射性プローブの Br-BTdU は、増殖能イメージングプローブとして有効なだけでなく、増殖能の高いがん細胞に対し治療効果も持つことを見出した。

## 研究方法

目的達成のため、1. がんの代謝特性に基づく薬剤の探索・作用機序解析、2. がんの生物学的特性の検出法、3. 作用コンセプトに基づく動物実験モデル構築と検証 の3つの観点から取り組む。3年計画最終の本年度では、各研究項目の推進を図るとともに、構築してきたモデル系を軸に班員間のあらゆる形での共同作業を進め、診断・治療法開発のための評価系の構築を目指す。以下に、具体的計画及び方法を述べる。

### 1. がんの代謝特性に基づく薬剤の探索・作用機序解析

#### 1) 栄養飢餓条件下で作用する薬剤の探索とその機序解析 (門田・土原)

アルクチゲニン含有植物、漢方薬、ミャンマー伝統薬物を中心に、栄養飢餓状態で選択的に殺細胞活性を示す新規活性物質を探索する。また、活性物質アルクチゲニンの合成経路等を用い、細胞のストレス応答シグナルや生存シグナル伝達系を中心に、作用機序解析を行う。また、既存抗がん剤や漢方方剤との併用効果を検討する。

#### 2) 栄養飢餓条件下で作用する薬剤のメタボローム解析 (曾我)

昨年度までのメタボローム解析により、栄養飢餓条件下で作用する薬剤のエネルギー代謝阻害が明らかになった。本年度は、これらの薬剤と電子伝達系阻害剤の作用についてメタボローム比較解析を進め、薬剤標的の絞り込みを行う。

#### 3) 栄養飢餓条件下での細胞応答の制御薬剤の探索とその機序解析 (富田)

上記の飢餓標的薬剤と VST 等の小胞体ストレス応答阻害薬剤との作用機序の共通性について、基盤情報として共有を進める。加えて、がん細胞パネルを活用し化合物間の活性比較を引き続き行い、また新たに、3次元培養系を用いた薬剤の活性と作用機序の評価実験を行い、共有基盤情報の強化を図る。

#### 4) 脂質代謝を標的とする治療法の分子基盤 (清宮)

前年度の成果を踏まえ、脂質代謝酵素 ACLY の枯渇によるがん細胞の増殖抑制機構として、AMP キナーゼ、活性酸素種の関与を検討する。また、トランスクリプトームやメタボローム解析から抽出した ACLY 枯渇による変動因子群の、効果マーカーとしての検証を行う。

### 2. がんの生物学的特性の検出法

#### 1) 微小環境評価に向けた測定法、画像化技術の開発 (清野・浦野)

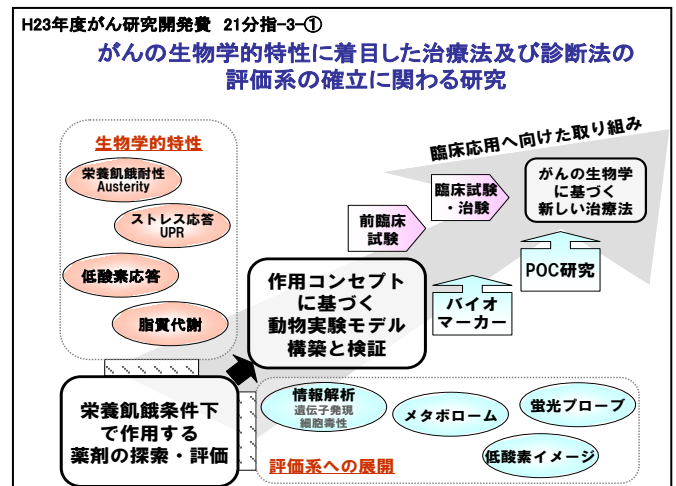
低酸素細胞集積性 Cu-ATSM について、<sup>62</sup>Cu-ATSM-PET による低酸素領域の描出の臨床研究を目指した検討を進める。昨年度までに作製に成功した、放射性臭素標識チミジン誘導体や各種加水分解酵素活性検出蛍光プローブについては、担がんマウスにおける腫瘍集積性や、免疫染色像とインビボイメージング画像との比較を行い、プローブ開発のための基礎的知見を得る。

#### 2) メタボローム解析による生物学的特性の検出 (曾我・富田)

栄養飢餓条件下で作用する薬剤を投与された種々の腫瘍モデルや、モデル生物の血液や尿、組織抽出物のメタボローム解析を引き続き行い、in vivo 環境における代謝変化について検討する。

### 3. 作用コンセプトに基づく動物実験モデル構築と検証 (富田・浦野・清宮)

栄養飢餓条件下で作用する化合物が in vivo でも想定している環境や機序で作用し得るかを、引き続き検討する。具体的には、ヌードマウス移植ヒト腫瘍を用い、薬剤や環境ストレスに対する応答性、代謝変化について、免疫染色等によって検討する。また、標的として有望な脂質代謝酵素 ACLY について、ノックダウンの制がん効果と、上記の研究で同定されたマーカーの妥当性を組織レベルで検証する。さらに、モデルマウス中のがん部位と正常部位の各種蛍光プローブによるイメージングの検討を行う。こうした解析を通じ、微小環境に着目した治療法や診断法の評価系の確立に必要な情報を、班として蓄積・共有し、適切な動物実験モデル系の構築に結びつける。



## 研究成果と考察

全期間（第3年次評価時点）

【成果】平成21年度から23年度までの研究成果を以下に項目ごとにまとめて述べる。

### 1. がんの代謝特性に基づく薬剤の探索・作用機序解析

#### 1-1) 栄養飢餓条件下で作用する薬剤の探索と評価

ストレス応答UPRは栄養飢餓環境下でのがん細胞の生存に重要な役割を果たす。これまでに、抗腫瘍効果を有するUPR阻害化合物としてVSTやビグアナイド系糖尿病薬などを見出してきた。H21年度は、化合物処理後の遺伝子発現データを用いたインシリコ探索によって、UPR抑制活性を有する化合物として、新たにrottlerinなどの4化合物を見出すことに成功した。H22年度は、39種類のヒトがん細胞に対する細胞毒性パターンが、既知のUPR阻害化合物間で、非常に似通っていることを見出した。そして、これらの化合物と類似した細胞毒性パターンを示す化合物をインシリコ探索し、UPR抑制活性を示す化合物を新たに見出すことに成功した。そして、H23年度は、栄養飢餓選択的薬剤として開発の進められているアルクチゲニンとその誘導体について、39種類のヒトがん細胞に対する細胞毒性パターンを基盤に、既知のUPR抑制化合物との類似性を評価した。その結果、通常条件下で弱いながらも検出される、アルクチゲニンならびにその誘導体の細胞毒性のパターンは、既知のUPR抑制化合物と高い類似性を示すことが判明した。また、これらのアルクチゲニンとその誘導体については、UPRの抑制活性も検証され、細胞毒性パターンを用いた評価系の有用性が確認された。以上の成果より、遺伝子発現データや細胞毒性パターンによって、栄養飢餓環境下で作用するUPR抑制化合物を評価し、探索することが可能であることが明らかになったものとする。

一方で、薬用植物等から栄養飢餓環境下で選択的にがん細胞を死滅させる新たな化合物の探索研究を進めた。栄養飢餓耐性解除活性試験で活性を示したミャンマー産薬用植物KayeassamicaとVitex negundoから、活性物質としてKayeassamins (A, B, D, E, G)、ならびにchrysopenetin及びchrysosplenol Dをそれぞれ単離し、構造決定した。また、漢方薬の羌活から、栄養飢餓選択的毒性を持つ化合物OstruthinとBornyl ferulateを単離・同定した。アフリカの薬用植物であるGarcinia huillensisからは、強い栄養飢餓選択的毒性を持つ化合物Damnacanthalを単離・同定した。同じくアフリカの薬用植物Securidaca longepedunculataから、栄養飢餓選択的毒性を持つ数十種のキサントン類縁化合物を単離・構造決定した。その中で、1,6-dihydroxy-2,3,4,5,8-pentamethoxyxanthoneならびに3,6,8-trihydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthoneが比較的強い選択的細胞毒性を示した。さらに、(-)アルクチゲニンの化学変換により、9種の類縁体を得た。これらの化合物について、栄養飢餓選択的毒性の検討を行ったところ、(-)と(-)アルクチゲニンの全てのO-メチル基をO-エテル基に変えた合成化合物が最も強い活性を示した。一方、アルクチゲニンの光学異性体を含むWikstroemia indicaから精製した(+)アルクチゲニンは活性を示さなかったことから、その絶対構造が重要であることが明らかとなった。

#### 1-2) 栄養飢餓条件下での代謝特性と薬剤の作用機序解析

栄養欠乏状態におけるがん細胞のエネルギー代謝戦略を明らかにする目的で、7種のがん細胞株および4種の正常細胞をグルコース欠乏や低酸素の条件にて培養し、エネルギー代謝に関する100以上の物質の経時的な変化をCE-TOFMSにより測定した。得られたデータからがん細胞に特徴的な代謝変動を抽出したところ、フマル酸呼吸と呼ばれる特殊な嫌気呼吸の存在が明らかになった。具体的には、グルコース欠乏かつ低酸素条件では、フマル酸の低下、コハク酸の増加、アスパラギン酸等数種のアミノ酸の低下などの変動が、がん細胞株において有意に高いことが示された。さらにフマル酸呼吸を阻害することで知られるピルビニウムパモエートが、栄養欠乏条件において、特にがん細胞に対し顕著にコハク酸の蓄積を抑えATP生成を抑制することから、栄養飢餓に陥ったがん細胞がフマル酸呼吸によってエネルギー代謝を行っている可能性が強く示唆された。また、アルクチゲニンの作用機序をエネルギー代謝の観点から解明する目的で、グルコース有無の条件で薬剤を投与し、短時間および長時間の時系列メタボローム解析を行った。結果として、アルクチゲニン投与後数十分という短時間でTCA回路中間物質の低下や酸化型グルタチオンの増加、ATP等エネルギーチャージの低下が確認され、アルクチゲニンによる酸化的リン酸化の阻害が示唆された。これは、複合体阻害剤であるロテノン投与した際の、エネルギー代謝関連物質の変化が酷似していることから裏付けられた。

栄養飢餓耐性解除薬のアルクチゲニン、キガマイシン、パモ酸ピルビニウムの作用機序解析を行い、グルコース欠乏環境特異的にがん細胞の細胞内活性酸素種を急激に増大させ、それにとまってAKTの活性を低下させることを明らかにした。また、活性のない光学異性体の(+)アルクチゲニンを用いた生化学的解析においても、アルクチゲニンの作用機序にAKTのリン酸化の抑制が関与していることが明らかになった。他方、UPR阻害化合物の作用機序解析からは、エネルギー代謝制御に関わるmTORの阻害との関係が明らかになった。

#### 1-3) 脂質代謝を標的とする治療法の分子基盤

がん細胞はしばしば脂質を盛んに合成するが、脂質代謝酵素であるATP-クエン酸リアーゼ(ACLY)、アセチルCo-Aカ

ルボキシラーゼ (ACAC)、脂肪酸合成酵素 (FASN) のノックダウンにより、これら酵素の枯渇が様々ながん細胞の増殖抑制を導くことを見出した。特に効果の強かった ACLY についてさらに検討したところ、同酵素の枯渇による細胞増殖抑制は、ROS および AMPK のリン酸化のレベルが低い細胞で顕著であり、増殖抑制に伴っていずれのレベルも上昇した。これらのうち、ROS は増殖抑制効果の媒介因子として機能することが明らかになった。ACLY 枯渇による細胞増殖抑制に耐性を示した細胞では、ROS および AMPK リン酸化のレベルがいずれも高く、これらの因子が ACLY 阻害の制がん効果のバイオマーカーとなる可能性が示された。ヒト大腸がんでは、ステージが進行した腫瘍ほど AMPK リン酸化レベルおよび ROS レベルを反映する DNA 酸化損傷の程度が低く、ACLY の阻害に対して感受性を示す可能性が示された。トランスクリプトームおよびメタボローム解析を実施し、ACLY 枯渇の制がん効果を反映するマーカーの候補因子群を抽出した。

## 2. がんの生物学的特性の検出法

がん組織の微小環境評価に有用な RI 分子プローブや蛍光プローブの開発を目指し研究を行った。低酸素部位集積性の  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM を製造する段階で必須となる  $^{64}\text{Cu}$  自動精製装置を開発し、市販化した。この自動精製装置を用いて製造した  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の集積メカニズムを検討し、低酸素領域のみならずミトコンドリア機能不全領域に集積することを見出した。また担がんマウスを用いて、 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM から放出される  $\beta$ -線によるがんの内照射治療を試みたところ、本治療により、がんサイズが縮小することおよび転移能が低下することを見出した。また、 $^{62}\text{Cu}$ -ATSM を用いた臨床 PET イメージング研究では、扁平上皮がんと腺がんでは  $^{62}\text{Cu}$ -ATSM と  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積パターンが異なることを見いだした。一方、新しい放射性プローブの Br-BTdU の研究では、放射性 Br-BTdU が増殖能の高いがん細胞に集積し、その細胞内での集積部位が DNA 画分であることを明らかにした。蛍光プローブの開発研究については、加水分解酵素活性を検出可能な蛍光プローブの設計法を確立し、種々のアミノペプチダーゼ活性を鋭敏に検出する蛍光プローブ群の開発に成功した。具体的にはロイシンアミノペプチダーゼや  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) などに対する蛍光プローブの開発に成功した。次に、これらのプローブ群を活用して正常細胞とがん細胞のアミノペプチダーゼ活性の網羅的な比較を行い、GGT 酵素活性ががん細胞で強く正常細胞で弱いことを見出した。この GGT プローブを用い、SHIN3 細胞を腹腔内に播種したがんモデルマウスにおいて、蛍光内視鏡下でプローブを散布することによって、がん部位と正常部位の境界を可視化できることが明らかとなった。

## 3. 作用コンセプトに基づく動物実験モデル構築と検証

上記の研究で見出した薬剤や標的分子が *in vivo* でも想定している環境や機序で作用するかを評価・検証する系の構築を目指し、UPR 阻害化合物のなかで水溶性ビッグアニドのブホルミンを用い、薬剤の到達性の問題を回避できる、実験腫瘍内への直接投与による検討を行った。設定した実験条件に従い、胃がん MKN74 細胞のゼノグラフトへブホルミンを腫瘍内投与し、ゼノグラフトを回収し組織染色を行ったところ、薬剤投与により、培養細胞系での知見とよく合致し、がん抑制因子としても知られる翻訳開始抑制因子 4E-BP1 の脱リン酸化が観察された。また、重要なことに、ブホルミンは経口投与でも抗腫瘍効果を示すことがわかった。一方、アルクチゲニンの治療効果の検証実験を進め、ヒト膵臓がんゼノグラフトモデルにおいて、ゲムシタピンの併用によってそれぞれ単独よりも有効性が高まることを見出した。さらに、栄養飢餓選択的薬剤を用いた研究から、これらの薬剤の中にはミトコンドリア機能を抑制するものが多く含まれることが明らかになってきたが、こうした薬剤の抗腫瘍効果と合致して、ミトコンドリア DNA を欠損した  $\rho^0$  細胞株は造腫瘍性が非常に低いことを見出した。

【考察】全期間を通じ、班内の協力体制を活用した研究が順調に進んだものと考えている。特に、班員がおのおの、別々のアッセイ系で見出してきた、栄養飢餓耐性解除薬と UPR 抑制薬剤が非常に類似した作用を有していることを明らかにすることができた点や、研究班内での共同研究が原動力となり、現在開発の進められているアルクチゲニンが両作用を有することを明らかにできた点は、班研究としての重要な成果であると考えている。また、栄養飢餓耐性解除薬や UPR 抑制薬剤が殺細胞効果を発揮するメカニズムには不明な点が多かったが、活性酸素種の制御が重要な役割を果たすことが明らかになり、この現象にはミトコンドリアの機能阻害が関わっていることも推測された。こうした作用機序の解明には、メタボローム解析が極めて有用であったと考える。なお、アルクチゲニンについては、現在、牛蒡子を特別な方法で作製した高含量のアルクチゲニンを含んだエキスの顆粒剤を用い、ゲムシタピン不応すい臓がん患者を対象とした臨床試験が開始されている。こうした臨床試験を効率的・効果的に進めるためにも、さらなる作用機序解析やバイオマーカーの開発研究を進める必要があると考える。一方で、新しい化合物の探索も重要であるが、ミャンマーやアフリカの伝統薬物から単離した活性物質の中からは、アルクチゲニンより強い活性を有する化合物は見出せなかった。しかしながら、本研究班で構築した、遺伝子発現データや細胞毒性パターンを活用した類似性の比較による評価法では、これまでに見つかった化合物とは類似性を示さない新しいタイプの化合物があることを示唆する結果を得ている。今後こうした化合物の解析を進めることで、新しいメカニズムの発見につながることも期待でき、さらに研究を継続することが必要である。こうした新しい方向性の研究については、脂質代謝を標的とした新しい研究や応用性の高い蛍光プローブの研究などと組合せることが肝要ではないかと考えている。今後も、本研究で構築された協力体制を活用し、微小環境

に着目した治療法・診断法の評価系の確立に必用な研究を推進していきたいと考えている。

全期間（研究終了時）

【成果】平成21年度から23年度までの研究成果を以下に項目ごとにまとめて述べる。

## 1. がんの代謝特性に基づく薬剤の探索・作用機序解析

### 1-1) 栄養飢餓条件下で作用する薬剤の探索と評価

ストレス応答UPRは栄養飢餓環境下でのがん細胞の生存に重要な役割を果たす。これまでに、抗腫瘍効果を有するUPR阻害化合物としてVSTやビグアナイド系糖尿病薬などを見出してきた。H21年度は、化合物処理後の遺伝子発現データを用いたインシリコ探索によって、UPR抑制活性を有する化合物として、新たにrottlerinなどの4化合物を見出すことに成功した。H22年度は、39種類のヒトがん細胞に対する細胞毒性パターンが、既知のUPR阻害化合物間で、非常に似通っていることを見出した。そして、これらの化合物と類似した細胞毒性パターンを示す化合物をインシリコ探索し、UPR抑制活性を示す化合物を新たに見出すことに成功した。そして、H23年度は、栄養飢餓選択的薬剤として開発の進められているアルクチゲニンとその誘導体について、39種類のヒトがん細胞に対する細胞毒性パターンを基盤に、既知のUPR抑制化合物との類似性を評価した。その結果、通常条件下で弱いながらも検出される、アルクチゲニンならびにその誘導体の細胞毒性のパターンは、既知のUPR抑制化合物と高い類似性を示すことが判明した。また、これらのアルクチゲニンとその誘導体については、UPRの抑制活性も検証され、細胞毒性パターンを用いた評価系の有用性が確認された。以上の成果より、遺伝子発現データや細胞毒性パターンによって、栄養飢餓環境下で作用するUPR抑制化合物を評価し、探索することが可能であることが明らかになったものとする。

一方で、薬用植物等から栄養飢餓環境下で選択的にがん細胞を死滅させる新たな化合物の探索研究を進めた。栄養飢餓耐性解除活性試験で活性を示したミャンマー産薬用植物KayeassamicaとVitex negundoから、活性物質としてKayeassamins (A, B, D, E, G)、ならびにchrysoplenetin及びchrysosplenol Dをそれぞれ単離し、構造決定した。また、漢方薬の羌活から、栄養飢餓選択的毒性を持つ化合物OstruthinとBornyl ferulateを単離・同定した。アフリカの薬用植物であるGarcinia huillensisからは、強い栄養飢餓選択的毒性を持つ化合物Dammacanthalを単離・同定した。同じくアフリカの薬用植物Securidaca longepedunculataから、栄養飢餓選択的毒性を持つ数十種のキサントン類縁化合物を単離・構造決定した。その中で、1,6-dihydroxy-2,3,4,5,8-pentamethoxyxanthoneならびに3,6,8-trihydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthoneが比較的強い選択的細胞毒性を示した。さらに、(-)アルクチゲニンの化学変換により、9種の類縁体を得た。これらの化合物について、栄養飢餓選択的毒性の検討を行ったところ、(-)アルクチゲニンと(-)アルクチゲニンの全てのO-メチル基をO-エテル基に変えた合成化合物が最も強い活性を示した。一方、アルクチゲニンの光学異性体を含有するWikstroemia indicaから精製した(+)アルクチゲニンは活性を示さなかったことから、その絶対構造が重要であることが明らかとなった。

### 1-2) 栄養飢餓条件下での代謝特性と薬剤の作用機序解析

栄養欠乏状態におけるがん細胞のエネルギー代謝戦略を明らかにする目的で、7種のがん細胞株および4種の正常細胞をグルコース欠乏や低酸素の条件にて培養し、エネルギー代謝に関与する100以上の物質の経時的な変化をCE-TOFMSにより測定した。得られたデータからがん細胞に特徴的な代謝変動を抽出したところ、フマル酸呼吸と呼ばれる特殊な嫌気呼吸の存在が明らかになった。具体的には、グルコース欠乏かつ低酸素条件では、フマル酸の低下、コハク酸の増加、アスパラギン酸等数種のアミノ酸の低下などの変動が、がん細胞株において有意に高いことが示された。さらにフマル酸呼吸を阻害することで知られるピルビニウムパモエートが、栄養欠乏条件において、特にがん細胞に対し顕著にコハク酸の蓄積を抑えATP生成を抑制することから、栄養飢餓に陥ったがん細胞がフマル酸呼吸によってエネルギー代謝を行っている可能性が強く示唆された。また、アルクチゲニンの作用機序をエネルギー代謝の観点から解明する目的で、グルコース有無の条件で薬剤を投与し、短時間および長時間の時系列メタボローム解析を行った。結果として、アルクチゲニン投与後数十分という短時間でTCA回路中間物質の低下や酸化型グルタチオンの増加、ATP等エネルギーチャージの低下が確認され、アルクチゲニンによる酸化的リン酸化の阻害が示唆された。これは、複合体阻害剤であるロテノン投与した際の、エネルギー代謝関連物質の変化が酷似していることから裏付けられた。

栄養飢餓耐性解除薬のアルクチゲニン、キガマイシン、パモ酸ピルビニウムの作用機序解析を行い、グルコース欠乏環境特異的にがん細胞の細胞内活性酸素種を急激に増大させ、それにとまってAKTの活性を低下させることを明らかにした。また、活性のない光学異性体の(+)アルクチゲニンを用いた生化学的解析においても、アルクチゲニンの作用機序にAKTのリン酸化の抑制が関与していることが明らかになった。他方、UPR阻害化合物の作用機序解析からは、エネルギー代謝制御に関わるmTORの阻害との関係が明らかになった。

### 1-3) 脂質代謝を標的とする治療法の分子基盤

がん細胞はしばしば脂質を盛んに合成するが、脂質代謝酵素である ATP-クエン酸リアーゼ (ACLY)、アセチル Co-A カルボキシラーゼ (ACAC)、脂肪酸合成酵素 (FASN) のノックダウンにより、これら酵素の枯渇が様々ながん細胞の増殖抑制を導くことを見出した。この現象には細胞選択性が認められ、正常細胞や一部のがん細胞株は抵抗性を示すことも明らかとなった。これらの結果から、脂質代謝酵素の阻害は適切ながん種選択のもと、有効ながん治療法として応用できる可能性が示唆された。酵素群の中でも特に効果の強かった ACLY についてさらに検討したところ、同酵素の枯渇による細胞増殖抑制は、ROS および AMPK のリン酸化のレベルが低い細胞で顕著であり、増殖抑制に伴っていずれのレベルも上昇した。これらのうち、ROS は増殖抑制効果の媒介因子として機能することが明らかになった。ACLY 枯渇による細胞増殖抑制に耐性を示した細胞では、ROS および AMPK リン酸化のレベルがいずれも高く、これらの因子が ACLY 阻害の制がん効果のバイオマーカーとなる可能性が示された。さらにトランスクリプトームおよびメタボローム解析を実施し、中性脂質をはじめ、ACLY 枯渇の制がん効果を反映するマーカーの候補因子群を抽出した

## 2. がんの生物学的特性の検出法

がん組織の微小環境評価に有用な RI 分子プローブや蛍光プローブの開発を目指し研究を行った。低酸素部位集積性の  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM を製造する段階で必須となる  $^{64}\text{Cu}$  自動精製装置を開発し、市販化した。この自動精製装置を用いて製造した  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM の集積メカニズムを検討し、低酸素領域のみならずミトコンドリア機能不全領域に集積することを見出した。また担がんマウスを用いて、 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM から放出される  $\beta$ -線によるがんの内照射治療を試みたところ、本治療により、がんサイズが縮小することおよび転移能が低下することを見出した。また、 $^{62}\text{Cu}$ -ATSM を用いた臨床 PET イメージング研究では、扁平上皮がんと腺がんでは  $^{62}\text{Cu}$ -ATSM と  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積パターンが異なることを見いだした。一方、新しい放射性プローブの Br-BTdU の研究では、放射性 Br-BTdU が増殖能の高いがん細胞に集積し、イメージングプローブとして有用であること、および、内照射治療薬剤としての可能性を有することを見出した。蛍光プローブの開発研究については、加水分解酵素活性を検出可能な蛍光プローブの設計法を確立し、種々のアミノペプチダーゼ活性を鋭敏に検出する蛍光プローブ群の開発に成功した。具体的にはロイシニアミノペプチダーゼや  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) などに対する蛍光プローブの開発に成功した。次に、これらのプローブ群を活用して正常細胞とがん細胞のアミノペプチダーゼ活性の網羅的な比較を行い、GGT 酵素活性ががん細胞で強く正常細胞で弱いことを見出した。また培養がん細胞での網羅的な解析の結果、GGT 活性の亢進が見られるのは 5, 6 割程度であり、GGT 酵素活性のがん細胞間での heterogeneity が強いことも同時に明らかになった。この GGT プローブを用い、SHIN3 細胞を腹腔内に播種したがんモデルマウスにおいて、蛍光内視鏡下でプローブを散布することによって、がん部位と正常部位の境界を可視化できることが明らかとなった。

## 3. 作用コンセプトに基づく動物実験モデル構築と検証

上記の研究で見出した薬剤や標的分子が in vivo でも想定している環境や機序で作用するかを評価・検証する系の構築を目指し、UPR 阻害化合物のなかで水溶性ビッグアニドのブホルミンを用い、薬剤の到達性の問題を回避できる、実験腫瘍内への直接投与による検討を行った。設定した実験条件に従い、胃がん MKN74 細胞のゼノグラフトへブホルミンを腫瘍内投与し、ゼノグラフトを回収し組織染色を行ったところ、薬剤投与により、培養細胞系での知見とよく合致し、がん抑制因子としても知られる翻訳開始抑制因子 4E-BP1 の脱リン酸化が観察された。また、重要なことに、ブホルミンは経口投与でも抗腫瘍効果を示すことがわかった。一方、アルクチゲニンの治療効果の検証実験を進め、ヒト膵臓がんゼノグラフトモデルにおいて、ゲムシタピンの併用によってそれぞれ単独よりも有効性が高まることを見出した。さらに、栄養飢餓選択的薬剤を用いた研究から、これらの薬剤の中にはミトコンドリア機能を抑制するものが多く含まれることが明らかになってきたが、こうした薬剤の抗腫瘍効果と合致して、ミトコンドリア DNA を欠損した  $\rho^0$  細胞株は造腫瘍性が非常に低いことを見出した。

【考察】全期間を通じ、班内の協力体制を活用した研究が順調に進んだものと考えている。特に、班員がおのおの、別々のアッセイ系で見出してきた、栄養飢餓耐性解除薬と UPR 抑制薬剤が非常に類似した作用を有していることを明らかにすることができた点や、研究班内での共同研究が原動力となり、現在開発の進められているアルクチゲニンが両作用を有することを明らかにできた点は、班研究としての重要な成果であると考えている。また、栄養飢餓耐性解除薬や UPR 抑制薬剤が殺細胞効果を発揮するメカニズムには不明な点が多かったが、活性酸素種の制御が重要な役割を果たすことが明らかになり、この現象にはミトコンドリアの機能阻害が関わっていることも推測された。こうした作用機序の解明には、メタボローム解析が極めて有用であったと考える。なお、アルクチゲニンについては、現在、牛蒡子を特別な方法で作製した高含量のアルクチゲニンを含んだエキスの顆粒剤を用い、ゲムシタピン不応すい臓がん患者を対象とした臨床試験が開始されている。こうした臨床試験を効率的・効果的に進めるためにも、さらなる作用機序解析やバイオマーカーの開発研究を進める必要があると考える。一方で、新しい化合物の探索も重要であるが、ミャンマーやアフリカの伝統薬物から単離した活性物質の中からは、アルクチゲニンより強い活性を有する化合物は見出せなかった。しかしながら、本研究班で構築した、遺伝子発現データや細胞毒性パターンを活用した類似性の比較による評価法では、これ



までに見つかった化合物とは類似性を示さない新しいタイプの化合物があることを示唆する結果を得ている。今後こうした化合物の解析を進めることで、新しいメカニズムの発見につながることも期待でき、さらに研究を継続することが必要である。こうした新しい方向性の研究については、脂質代謝を標的とした新しい研究や応用性の高い蛍光プローブの研究などと組合せることが肝要ではないかと考えている。今後も、本研究で構築された協力体制を活用し、微小環境に着目した治療法・診断法の評価系の確立に必用な研究を推進していきたいと考えている。

## 倫理面への配慮

本研究は、主に動物や培養細胞を用いた研究であり、これらに関しては、各施設の倫理審査委員会での審査を受けて研究を推進している。DNA 組換え実験、動物実験、細胞生物学的実験等については、一般的な法令、動物実験指針等を遵守するとともに、各施設の動物実験等取扱規程、遺伝子組換え実験安全規程等に従って行った。メタボロミクス解析や蛍光プローブ研究など臨床材料を用いる研究を行う場合、また臨床検体の遺伝子解析等を行う必要が生じた場合には、臨床研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等を遵守し、各施設で倫理審査を受け、匿名化試料のみを扱うなどの適切な措置を講じる。<sup>62</sup>Cu-ATSM のジェネレーターを用いた臨床研究や、薬物の臨床導入を目指す場合には、早い段階から倫理審査を受ける。現時点では臨床研究登録の予定はないが、必要に応じ登録を行う。

## 本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

### 【2011 年度】

- Matsuo J, Tsukumo Y, Saito S, Tsukahara S, Sakurai J, Sato S, Kondo H, Ushijima M, Matsuura M, Watanabe T, Tomida A. Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. *Mol Cancer Ther*, in press.
- Saito S, Tomida A. Use of chemical genomics in assessment of the UPR. *Methods Enzymol*, 491:327-41, 2011.
- Awale S, Linn TZ, Li F, Tezuka Y, Myint A, Tomida A, Yamori T, Esumi H, Kadota S. Identification of Chrysoplenetin from *Vitex negundo* as a Potential Cytotoxic Agent against PANC-1 and a Panel of 39 Human Cancer Cell Lines (JFCR-39). *Phytother Res*, 25:1770-1775, 2011.
- Assaily W, Rubinger DA, Wheaton K, Lin Y, Ma W, Xuan W, Brown-Endres L, Tsuchihara K, Mak TW, Benchimol S. ROS-Mediated p53 Induction of Lpin1 Regulates Fatty Acid Oxidation in Response to Nutritional Stress. *Mol Cell*, 44:491-501, 2011.
- Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, Kannan K, Kiarash R, Mason J, Huang P, Sawyer SK, Fuerth B, Faubert B, Kalliomäki T, Elia A, Luo X, Nadeem V, Bungard D, Yalavarthi S, Growney JD, Wakeham A, Moolani Y, Silvester J, Ten AY, Bakker W, Tsuchihara K, Berger SL, Hill RP, Jones RG, Tsao M, Robinson MO, Thompson CB, Pan G, Mak TW. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev*, 25:1041-1051, 2011.
- Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci*, 102:975-982, 2011.
- Li F, He Y-M, Awale S, Kadota S, Tezuka Y. Two New Cytotoxic Phenylallylflavanones from Mexican Propolis. *Chem Pharm Bull*, 59:1194-1196, 2011.
- Tezuka Y, Morikawa K, Li F, Auw L, Awale S, Nobukawa T, Kadota S. Cytochrome P450 3A4 Inhibitory Constituents of the Wood of *Taxus yunnanensis*. *J Nat Prod*, 74:102-105, 2011.
- Subehan, Takahashi N, Kadota S, Tezuka Y. Cytochrome P450 2D6 Inhibitory Constituents of *Lunasia amara*. *Phytochemistry Lett*, 4:30-33, 2011.
- Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M. Serum Metabolomics Reveals  $\gamma$ -glutamyl Dipeptides as Biomarkers for discrimination among Different Forms of Liver Disease. *J Hepatol*, 55:896-905, 2011.
- Adam J, Hatipoglu E, O' Flaherty L, Ternette N, Sahgal N, Lockstone H, Baban D, Nye E, Stamp GW, Wolhuter K, Stevens M, Fischer R, Carmeliet P, Maxwell PH, Pugh CW, Frizzell N, Soga T, Kessler BM, El-Bahrawy M, Ratcliffe PJ, Pollard PJ. Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling. *Cancer Cell*, 20:524-537, 2011.

- Iino K, Sugimoto M, Soga T, Tomita M. Profiling of the Charged Metabolites of Traditional Herbal Medicines Using Capillary Electrophoresis time-of-flight Mass Spectrometry. *Metabolomics*, 8:99-108, 2012.
- Yoshii Y, Furukawa T, Kiyono Y, Watanabe R, Mori T, Yoshii H, Asai T, Okazawa H, Welch MJ, Fujibayashi Y. Internal radiotherapy with copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) reduces CD133+ highly tumorigenic cells and metastatic ability of mouse colon carcinoma. *Nucl Med Biol*, 38:151-157, 2011
- Oyama N, Hasegawa Y, Kiyono Y, Kobayashi M, Fujibayashi Y, Ponde DE, Dence C, Welch MJ, Yokoyama O. Early response assessment in prostate carcinoma by 18F-fluorothymidine following anticancer therapy with docetaxel using preclinical tumour models. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38:81-89, 2011.
- Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, Ogawa M, Mitsunaga M, Asanuma D, Kamiya M, Young MR, Nagano T, Choyke PL, Kobayashi H. Rapid cancer detection by topically spraying a  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med*, 3:110ra119, 2011.
- Kamiya M, Asanuma D, Kuranaga E, Takeishi A, Sakabe M, Miura M, Nagano T, Urano Y.  $\beta$ -Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation Based on Spirocyclized Rhodol Scaffold. *J Am Chem Soc*, 133:12960-12963, 2011.
- Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and its applications for biological imaging. *J Am Chem Soc*, 133:5680-5682, 2011.
- Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T: Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes utilizing photoinduced electron transfer. *ACS Chem Biol*, 6:600-608, 2011.
- Mashima T, Okabe S, Seimiya H. Molecular pharmacological approach reveals potential new strategies to suppress androgen receptor signaling in prostate cancer. *Mol Cell Pharmacol*, 3:7-12, 2011.
- Mashima T, Seimiya H. Role of acyl-CoA synthetases in glioma cell survival and its therapeutic implication. *Tumors of the Central Nervous System*, 1:337-340, 2011.

#### 【2010 年度】

- Haga N, Saito S, Tsukumo Y, Sakurai J, Furuno A, Tsuruo T, Tomida A. Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Sci*, 101:1125-1132, 2010.
- Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Yoon MY, Son ES, Tomida A, Ko B, Song SW, Shin-ya K, Hwang YI, Park HR. Arctigenin blocks the unfolded protein response and shows therapeutic antitumor activity. *J Cell Physiol*, 224:33-40, 2010.
- Misawa A, Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, Fujita N. AP-1-Dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. *Oncol Res*, 19:23-33, 2010.
- Miyake K, Tezuka Y, Awale S, Li F, Kadota S. Canthin-6-one alkaloids and a tirucallanoid from *Eurycoma longifolia* Jack. *Nat Prod Commun*, 5:17-22, 2010.
- He CC, Hui RR, Tezuka Y, Kadota S, Li JX. Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes bidentata* in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*, 127:229-234, 2010.
- Li F, Awale S, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *J Nat Prod*, 73:623-627, 2010.
- Miyake K, Li F, Tezuka Y, Awale S, Kadota S. Cytotoxic Activity of Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Nat Prod Commun*, 5:1009-1012, 2010.
- Morikawa K, Tanaka K, Li F, Awale S, Tezuka Y, Nobukawa T, Kadota S. Analysis of MS/MS fragmentation of taxoids. *Nat Prod Commun*, 5:1551-1556, 2010.
- Li F, Awale S, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Cytotoxicity of Constituents from Mexican Propolis Against a Panel of Six Different Cancer Cell Lines. *Nat Prod Commun*, 5:1601-1606, 2010.
- Widyowati R, Miyahara T, Tezuka Y, Awale S, Kadota S. Enhancement of alkaline phosphatase (ALP) activity by Indonesian medicinal plants and active constituents of *Barleria lupulina*. *Nat Prod Commun*, 5:1711-1716, 2010.
- Kitagawa M, Ikeda S, Tashiro E, Soga T, Imoto M. Metabolomic Identification of the Target of the Filopodia Protrusion Inhibitor Glucopiericidin A. *Chem Biol*, 17:989-998, 2010.
- Sugimoto M, Hirayama A, Robert M, Abe S, Soga T, Tomita M. Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction and isotopic pattern information in CE-TOFMS data. *Electrophoresis*, 31:1-8,

- 2010.
- Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai YM, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Tanaka K, Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T. MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences. *J Mass Spectro*, 45:703-714, 2010.
- Sugimoto M, Hirayama A, Ithikawa T, Robert M, Baran R, Uehara K, Kawai K, Soga T, Tomita M. Differential Metabolomics Software for Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Data Analysis. *Metabolomics*, 6:27-41, 2010.
- Sugimoto M, Wong D, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry-based Saliva Metabolomics Identified Oral, Breast and Pancreatic Cancer-Specific Profiles. *Metabolomics*, 6:78-95, 2010.
- Yoshii Y, Furukawa T, Kiyono Y, Watanabe R, Waki A, Mori T, Yoshii H, Oh M, Asai T, Okazawa H, Welch MJ, Fujibayashi Y. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) accumulates in rich regions of CD133+ highly tumorigenic cells in mouse colon carcinoma. *Nucl Med Biol*, 37:395-404, 2010
- Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem Rev*, 110:2620-40, 2010.
- Mashima T, Okabe S, Seimiya H. Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormone-refractory prostate cancer cell growth. *Mol Pharmacol*, 78:846-854, 2010.

#### 【2009 年度】

- Saito S, Furuno A, Sakurai J, Sakamoto A, Park HR, Shin-Ya K, Tsuruo T, Tomida A. Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res*, 69:4225-4234, 2009.
- Tsukumo Y, Tsukahara S, Saito S, Tsuruo T, Tomida A. A novel endoplasmic reticulum export signal: proline at the +2-position from the signal peptide cleavage site. *J Biol Chem*, 284:27500-27510, 2009.
- Matsuo J, Tsukumo Y, Sakurai J, Tsukahara S, Park HR, Shin-ya K, Watanabe T, Tsuruo T, Tomida A. Preventing the unfolded protein response via aberrant activation of 4E-binding protein 1 by versipelostatatin. *Cancer Sci*, 100:327-333, 2009.
- Arnaudeau S, Arboit P, Bischof P, Shin-ya K, Tomida A, Tsuruo T, Irion O, Cohen M. Glucose-regulated protein 78: a new partner of p53 in trophoblast. *Proteomics*, 9:5316-5327, 2009.
- Miyawaki J, Matsumura S, Yuge R, Murakami T, Sato S, Tomida A, Tsuruo T, Ichihashi T, Fujinami T, Irie H, Tsuchida K, Iijima S, Shiba K, Yudasaka M. Biodistribution and ultrastructural localization of single-walled carbon nanohorns determined in vivo with embedded Gd2O3 labels. *ACS Nano*, 3:1399-1406, 2009.
- Matsumura S, Sato S, Yudasaka M, Tomida A, Tsuruo T, Iijima S, Shiba K. Prevention of carbon nanohorn agglomeration using a conjugate composed of comb-shaped polyethylene glycol and a peptide aptamer. *Mol Pharm*, 6:441-447, 2009.
- Yun J, Kim YI, Tomida A, Choi CH. Regulation of DNA topoisomerase IIalpha stability by the ECV ubiquitin ligase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 389:5-9, 2009.
- Li F, Awale S, Zhang H, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *J Nat Prod*, 72:1283-1287, 2009.
- Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic Constituents of Propolis from Myanmar and Their Structure-activity Relationship. *Biol Pharm Bull*, 32:2075-2078, 2009.
- Awale S, Miyamoto T, Linn TZ, Li F, Win NN, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Cytotoxic Constituents of Soymida febrifuga from Myanmar. *J Nat Prod*, 72:1631-1636, 2009.
- Miyake K, Tezuka Y, Awale S, Li F, Kadota S. Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *J Nat Prod*, 72:2135-2140, 2009.
- Minami Y, Kasukawa T, Kakazu Y, Iigo M, Sugimoto M, Ikeda S, Yasui A, van der Horst G, Soga T, Ueda H. Measurement of Internal Body Time by Blood Metabolomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:9890-9895, 2009.
- Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-flight Mass Spectrometry. *Cancer Res*, 69:4918-4925, 2009.

- Soga T, Igarashi K, Itoh C, Mizobuchi K, Zimmermann H, Tomita M. Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 81:6165-6174, 2009.
- Oh M, Tanaka T, Kobayashi M, Furukawa T, Mori T, Kudo T, Fujieda S, Fujibayashi Y. Radio-copper-labeled Cu-ATSM: an indicator of quiescent but clonogenic cells under mild hypoxia in a Lewis lung carcinoma model. *Nucl Med Biol*, 36:419-26, 2009.
- Izumi S, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells. *J Am Chem Soc*, 131:10189-10200, 2009.
- Koide Y, Urano Y, Yatsushige A, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. Design and development of enzymatically activatable photosensitizer based on unique characteristics of thiazole orange. *J Am Chem Soc*, 131: 6058-6059, 2009.
- Mashima T, Sato S, Okabe S, Miyata S, Matsuura M, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H. Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci*, 100:1556-1562, 2009.
- Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer*, 100:1369-1372, 2009.
- Mashima T, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene*, 28:9-19, 2009.